

Werkstoffe in der biologischen Forschung

Dr. G. Schmalz, Tübingen

Zahnärztliche Werkstoffe müssen bestimmte physikalische, chemische und biologische Eigenschaften besitzen. So muß z. B. ein neues Amalgam Mindestanforderungen u. a. in bezug auf Druckfestigkeit und Expansionsverhalten erfüllen, um als Füllungsmaterial geeignet zu sein. Diese Mindestanforderungen und die Testverfahren, mit denen die entsprechenden Materialeigenschaften gemessen werden, sind seit den 20er Jahren in sogenannten Spezifikationen festgelegt, die in der Zwischenzeit ausgebaut und verbessert wurden. Bekannt sind Spezifikationen der ADA, des DIN-Verbandes oder — auf internationaler Ebene — der FDI/ISO. Allerdings werden nach diesen Spezifikationen allein physikalische und chemische Eigenschaften getestet. Für die Prüfung der Gewebeverträglichkeit fehlen bis heute national oder international verbindliche Testmethoden. In seinem Vortrag auf der 9. Tagung der Arbeitsgemeinschaft „Dentale Technologie“ in Stuttgart, ging Dr. Gottfried Schmalz der Frage nach, welche Verfahren hierbei eingesetzt werden können. Denn eine biologische Prüfung von zahnärztlichen Werkstoffen, ehe sie auf den Markt kommen, scheint aus Gründen der Qualitätssicherung und des Schutzes von Zahnarzt, HelferIn, Zahntechniker und Patient unentbehrlich.

Als Arzneimittel laut Arzneimittelgesetz (§ 2/Abs. 1) gelten im zahnärztlichen Bereich:

1. Prophylaxe-Mittel
2. Mittel zur Kavitätesinfektion
3. Kavitätenlacke und Unterfüllungsmaterialien
4. Hilfsmittel für Füllungen (Ätz- und Haftmittel)
5. Füllungswerkstoffe
6. Versiegler, Zahnlacke
7. Befestigungswerkstoffe
8. Wurzelkanal-Füllungsmaterialien
9. Wundverbände

Tabelle 1: Zusammenstellung von zahnärztlichen Materialien, die laut einem Beschluß der „Arbeitsgemeinschaft der Leitenden Medizinalbeamten der Länder“ (710-4-289-486/79) als Arzneimittel angesehen werden.

215
Diese Forderung hat auch Eingang in die Gesetzgebung gefunden: Nach Inkrafttreten des Arzneimittelgesetzes am 1. 1. 1980 werden viele zahnärztliche Werkstoffe als Arzneimittel (Tab. 1 und 2) angesehen, was in Zukunft biologische Testung verlangt.

Problematik

Umstritten ist die Frage nach geeigneten Prüfmethoden. Biologische Untersuchungen im allgemeinen und solche mit zahnärztlichen Materialien im besonderen bringen eine Reihe von Problemen mit sich, die eine standardisierte Prüfung erheblich erschweren: Die im biologischen Experiment auftretenden Variablen sind zahlreicher und schwerer kontrollierbar als im physikalischen Versuch.

So besitzt z. B. ein Versuchstier eine Individualität, eine

Als Gegenstände laut Arzneimittelgesetz (§ 2/Abs. 2 Nr. 2, 3) gelten im zahnärztlichen Bereich:

1. Künstliche Zähne
2. Brücken (auch Provisorien)
3. Kronen (auch Provisorien)
4. Voll- und Teilprothesen
5. Gußplomben*
6. Silberstifte
7. Gegenstände für Wurzel- (Nervkanal) Füllungen*
8. Haftscheiben
9. Gebißspangen*
10. Papierspitzen zum Trockenwischen* des Wurzelkanals

Tabelle 2: Zusammenstellung zahnärztlicher Materialien, die laut einem Beschluß der „Arbeitsgemeinschaft der Leitenden Medizinalbeamten der Länder“ (710-4-289-486/79) als Gegenstände angesehen werden und somit wie Arzneimittel getestet werden müssen.

* = Original-Wortlaut

Testmaschine dagegen nicht.

Es scheint außerdem nicht sinnvoll, zahnärztliche Materialien mit Testverfahren aus der Arzneimittelprüfung zu untersuchen, da sich Werkstoffe und Arzneimittel erheblich voneinander unterscheiden, was auch auf der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Prothetik und Werkstoffkunde in Berlin, 1980, unterstrichen wurde. Wir benötigen daher für zahnärztliche Materialien besondere Testmethoden.

Klinische Tests

In der Vergangenheit wurden zahnärztliche Werkstoffe oftmals direkt am Patienten auf ihre Gewebeverträglichkeit hin erprobt. Ein solches Vorgehen ist sicherlich dann am Platze und geeignet, wenn ein Material abschließend beurteilt und für den Markt freigegeben wer-

den soll. Allerdings verbieten ethische Gründe die Applikation eines neuen Werkstoffes sofort am Menschen.

Hinzu kommen technische Probleme: Es ist z. B. nicht möglich, aus der klinischen Untersuchung eines Zahnes die wahre, durch ein Füllungsmaterial bewirkte Pulpaschädigung zu erfassen. Eine histologische Beurteilung bedingt jedoch die Extraktion des entsprechenden Zahnes, was wiederum nur in gewissen Fällen, z. B. im Rahmen einer kieferorthopädischen Behandlung möglich ist. Dabei handelt es sich jedoch um die Zähne Jugendlicher mit einer vom Erwachsenen unterschiedlichen Anatomie.

Klinische Tests — so wertvoll sie sind — reichen als alleinige Methode zur Beschreibung und Messung der Gewebeverträglichkeit zahnärztlicher Materialien nicht aus. Sie sind zudem nach dem neuen Arzneimit-

Werkstoffe in der biologischen Forschung

telgesetz nur zulässig, wenn bestimmte Ergebnisse aus präklinischen Versuchen vorliegen.

Anwendungstests

Bei Verwendung von Versuchstieren sind die ethischen und technischen Probleme geringer. Werden die zu testenden Werkstoffe am Versuchstier so appliziert, wie es die spätere Verwendung am Patienten vorsieht, spricht man von „Anwendungstests“.

Als Versuchstiere kommen u. a. Miniaturschweine (Abb. 1) oder Rhesusaffen (Abb. 2 und 3) in Frage. Entsprechende Testverfahren sind in Spezifikationsentwürfen von ADA, DIN und FDI aufgenommen worden.

Aus ökonomischen aber auch aus Überlegungen des Tierschutzes heraus ist es jedoch nicht möglich, jedes neu entwickelte Material an solchen hochentwickelten Versuchstieren zu erproben.

Zellkulturen

Zur Prüfung der lokalen akuten Toxizität zahnärztlicher Werkstoffe sind in der Literatur Zellkulturen vorgeschlagen worden. Unter Zellkulturen versteht man Gewebe, die außerhalb des Körpers gehalten oder gezüchtet werden. Die Verwendung von Zellkulturen hat viele Vorteile: Das biologische Testsystem ist gut überschaubar, die Zahl der anfangs erwähnten Variablen ist gegenüber Tierversuchen oder gar klinischen Tests geringer. Die Versu-

che sind kostengünstig, zeitsparend, und es treten keine Probleme mit dem Tierschutz auf. Allerdings handelt es sich dabei um Versuchsanordnungen, bei denen die Situation des Werkstoffes in der Mundhöhle des Patienten nicht imitiert wird, wie es bei den Anwendungstests der Fall ist.

In unseren Untersuchungen der letzten Jahre sind wir deshalb der Frage nachgegangen, inwieweit drei stellvertretend für alle Zellkulturverfahren ausgewählte Methoden die Forderungen erfüllen, welche an ein standardisiertes biologisches Prüfverfahren gestellt werden.

Methoden

Folgende Verfahren haben wir in unsere Untersuchung einbezogen:

1. den Hämolyse-Test,
2. den Agar-Overlay-Test
3. den Wachstums-Inhibitions-Test.

Beim Hämolyse-Test wird das Untersuchungsmaterial in eine Suspension roter Blutkörperchen vom Kaninchen gegeben. Man benötigt dazu frisches, aus der marginalen Ohrvene eines Kaninchens entnommenes Blut, welches mit Zitrat ungerinnbar gemacht wird. Die bewirkte Zellerstörung wird photometrisch anhand des freigesetzten roten Blutfarbstoffes bestimmt (Abb. 4 und 5).

Die beiden anderen Testmethoden, der Agar-Overlay-Test und der Wachstums-Inhibitions-Test basieren auf der eigentlichen Zellkulturtechnik. Dabei werden

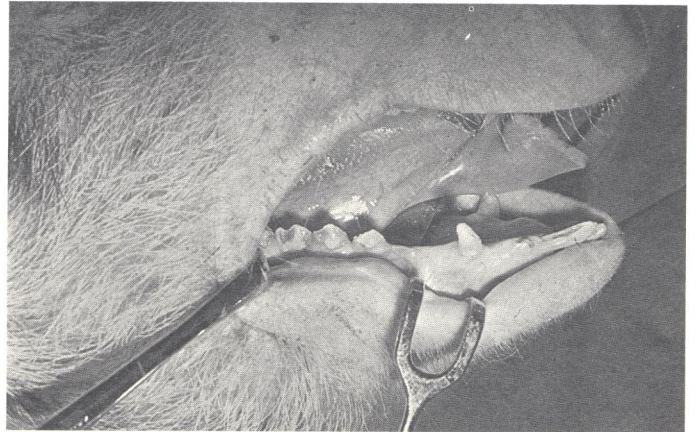


Abb. 1 Zahnhalsskavitäten, die am Göttinger Miniaturschwein gelegt wurden



Abb. 2 Zahnhalsskavitäten, die an Rhesus-Affen gelegt wurden (Frontzähne)

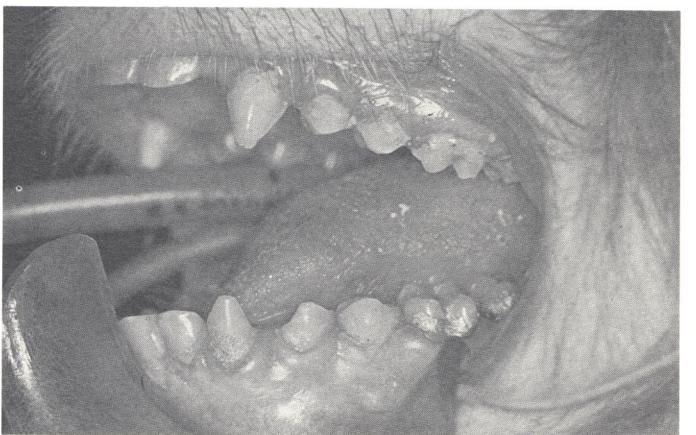


Abb. 3 Zahnhalsskavitäten, die am Rhesus-Affen gelegt wurden (Seitenzähne)

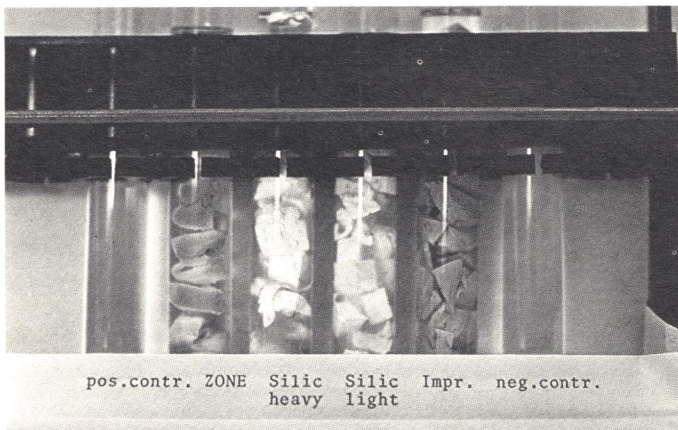


Abb. 4 Hämolysen-Test; Versuchsbeginn: Die Testmaterialien befinden sich in der Blutkörperchen-Suspension

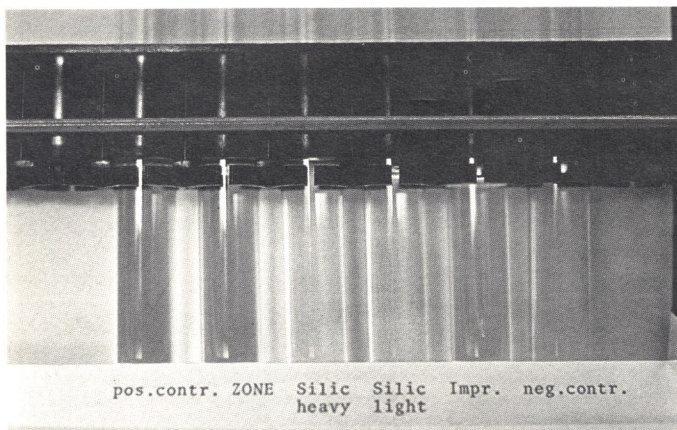


Abb. 5 Hämolysen-Test; Versuchsende: Die Testmaterialien sind entfernt, die Suspension ist zentrifugiert, nur der freigesetzte rote Blutfarbstoff ist noch erkennbar

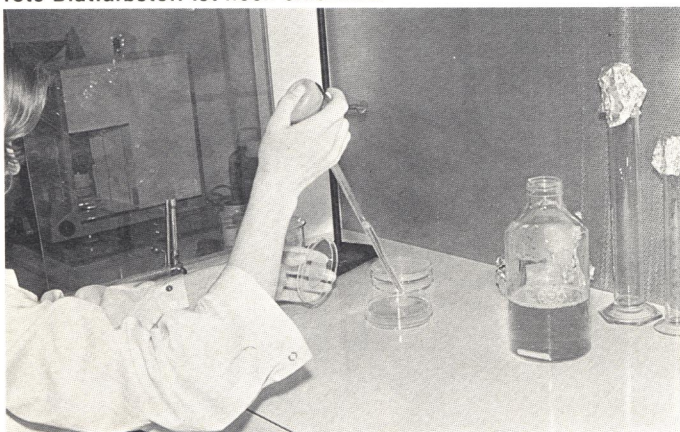


Abb. 6 Aussaat der Zell-Suspension auf Petrischalen

menschliche oder tierische Zellen außerhalb des Organismus auf einer Glas- bzw. Kunststoffunterlage oder auch in Suspension gezüchtet.

Am einfachsten lassen sich bösartige Tumorzellen in Kultur halten. Sie zeichnen sich bei geeigneter Nährlösung durch unbegrenztes Wachstum aus. Außerdem lassen sich sogenannte Klone züchten, d.h. Kulturen, die von einer einzigen Zelle abstammen. Diese Kulturen sind in ihrem biologischen Verhalten stabil, wenn gewisse Regeln der Zellzüchtung eingehalten werden. Die Zellen werden in zentralen Zellbanken gehalten und können von dort auf kommerziellem Wege bezogen werden.

Es ist also möglich, daß entsprechenden Laboratorien auf der ganzen Welt gleiche biologische Systeme zur Verfügung stehen — eine wesentliche Voraussetzung für eine standardisierte biologische Prüfung.

Beim Agar-Overlay-Test werden Tumorzellen von der Maus auf Petrischalen gezüchtet (Abb. 6) und, nachdem ein dichter Zellrasen gewachsen ist (Abb. 7) mit einem Agar überschichtet und anschließend mit einem roten Farbstoff (Neutralrot) angefärbt (Abb. 8). Ein auf den Agar appliziertes Material (Abb. 9) ruft je nach Grad seiner Toxizität einen mehr oder weniger großen Hof der Zellschädigung hervor.

Dabei geben die geschädigten Zellen den roten Farbstoff ab, wodurch eine Zone der Aufhellung entsteht, was in Kontaktabzügen (Abb. 10 und 11) als dunkles

Gebiet imponiert. Beim Wachstums-Inhibitions-Test wird ein Extrakt des Untersuchungsmaterials (z. B. Wurzelkanal-Füllpaste) hergestellt, indem es über 24 Stunden in Nährlösung ausgelaugt und der Überstand anschließend filtriert wird. Die wachstumshemmende Wirkung verschiedener Konzentrationen dieses Extraktes auf Tumorzellen von der Maus wird photometrisch gemessen (Abb. 12).

Das Ergebnis dieser Testmethode wird dargestellt als Dosis-Reaktions-Kurve (Abb. 13 und 14), wobei auf der Waagerechten die verschiedenen Konzentrationen des Extraktes, auf der Senkrechten das zugehörige Wachstum der Kultur aufgezeichnet wird. Die Steigerung der Dosis-Reaktions-Kurve kann als Maß für die Materialtoxizität gewertet werden.

Die Abb. 13 zeigt die Ergebnisse des Wurzelkanalfüllungsmaterials N2. Selbst bei einer Alterungszeit (= Zeit zwischen Anmischen und Versuchsbeginn) von 24 Stunden ergibt sich im Wachstums-Inhibitions-Test eine steile Dosis-Reaktionskurve, was für eine hohe Toxizität spricht. Demgegenüber ruft Guttapercha eine wesentlich geringere Zellreaktion hervor (Abb. 14). Mit den beschriebenen drei Testverfahren wurde ein breites Spektrum zahnärztlicher Werkstoffe getestet (Tab. 3).

Ergebnisse

Im Rahmen dieser Übersicht kann nicht im einzelnen auf die Resultate unserer Unter-

Werkstoffe in der biologischen Forschung

Testmaterialien:

1. Wachse und Basisplatten
2. Abdruckmaterialien
3. Reinigungs- und Poliermittel
4. Plaque-Färbemittel
5. Zahnpasten
6. Parodontalverbände
7. Kunststoffe (Kfo, Prothetik)
8. Füllungsmaterialien
9. Endodontische Materialien

Tabelle 3: Zusammenstellung der in eigenen Untersuchungen getesteten Materialien

suchungen eingegangen, sondern es sollen nur einige Punkte herausgegriffen werden. Es hat sich gezeigt, daß wir mit Hilfe von Zellkulturverfahren durchaus in der Lage sind, eine mögliche Giftigkeit zahnärztlicher Materialien unter standardisierten Bedingungen zu erfassen.

Dabei haben sich Testverfahren mit Fibroblastenkulturen wie der Agar-Overlay-Test und der Wachstums-Inhibitions-Test als geeigneter erwiesen als der Hämolyse-Test, da letzterer sehr wenig empfindlich ist und nur außerordentlich toxische Materialien angezeigt hat. Es lagen außerdem Anzeichen vor, daß beim Vergleich eines bekannten Werkstoffes mit einem nahe verwandten neuen Werkstoff die aus Zellkulturen erhaltenen Daten mit gewissen Einschränkungen Rückschlüsse auf die Gewebeverträglichkeit des neuen Werkstoffes am Patienten zulassen. Dabei muß jedoch berücksichtigt werden, daß die auf Zellkulturen ermittelte Giftigkeit durch eine aus dem Testmaterial ausge-

laugte chemische Substanz bedingt ist.

Die Gewebeverträglichkeit am Patienten wird darüber hinaus durch andere Faktoren beeinflusst, z.B. bakterielle Beläge in der Mundhöhle, Mikropalten zwischen Füllungsmaterial und Kavität oder durch eine exotherme Abbindereaktion.

Schlußfolgerungen

Die aus Zellkulturtests erhaltenen Ergebnisse können zur Beurteilung eines zahnärztlichen Werkstoffes beitragen. Dabei muß jedoch immer der mögliche therapeutische Wert des Testmaterials berücksichtigt werden. Ein Werkstoff, welcher in Zellkulturen ein toxisches — also giftiges — Verhalten zeigt, muß nicht von vornherein für eine klinische Verwendung ausscheiden. So ist der sehr toxische Silikat-Zement über Jahrzehnte hinweg als Frontzahn-Füllungs-Material verwendet worden, da es kein alternatives Material mit entsprechenden therapeutischen, d.h. in diesem Fall physikalisch-chemischen Eigenschaften gab.

Gleiches trifft für die im Rahmen der Säure-Ätz-Technik verwandte 38 %ige Phosphorsäure zu. Trotzdem waren die aus biologischen Tests gewonnenen Informationen zur Zytotoxizität wichtig, da man sich so durch geeignete Maßnahmen vor den unerwünschten Wirkungen schützen kann. Solche Informationen hätte man mit Testverfahren der Arzneimittelprüfung nur schwerlich erhalten können.

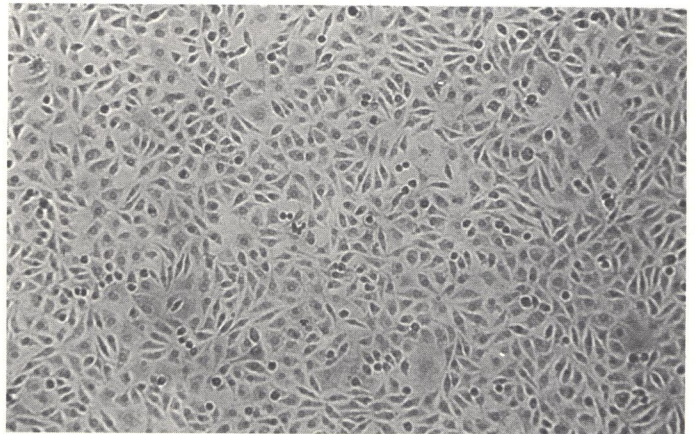


Abb. 7 Dichter Zellrasen, L-929 Mausfibroblasten

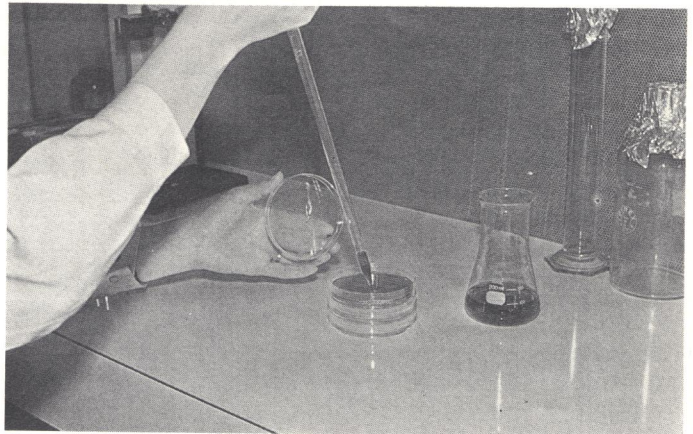


Abb. 8 Die Zellen werden angefärbt

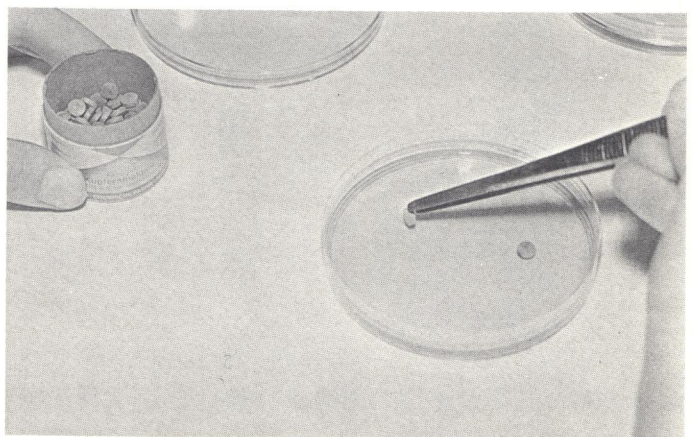


Abb. 9 Applikation des Testmaterials auf den Agar



Abb. 10 und 11 Kontaktabszug einer Agar-Platte des Agar-Overlay-Tests. Die Größe des Hofes um das Testmaterial ist ein Maß für die Toxizität des Werkstoffes. Bewertung Abb. 10 toxisch, Abb. 11 gering toxisch.

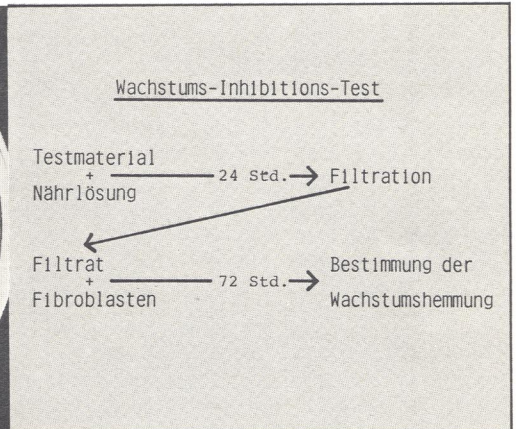


Abb. 12 Schematische Darstellung des Wachstums-Inhibitions-Tests

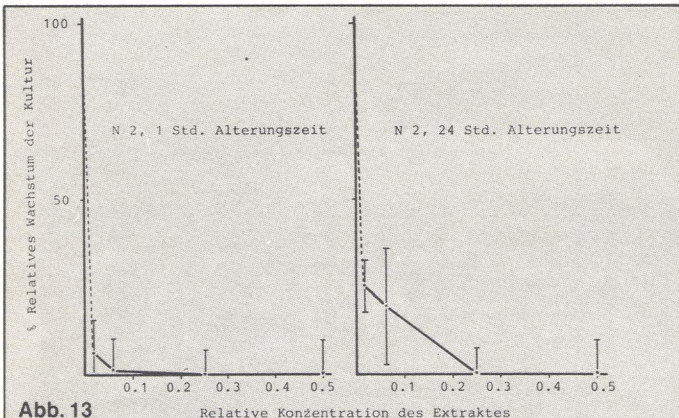


Abb. 13

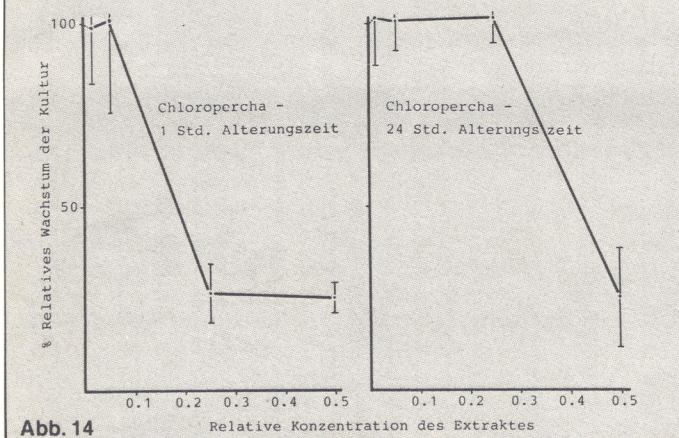


Abb. 14

Abb. 13 Ergebnisse aus dem Wachstums-Inhibitions-Tests für das Wurzelkanal-Füllungsmaterial N2; Liegezeit bedeutet Zeitraum zwischen Anmischen und Versuchsbeginn

Abb. 14 Ergebnisse aus dem Wachstums-Inhibitions-Test für das Wurzelkanal-Füllungsmaterial Chloropercha. Liegezeit bedeutet Zeitraum zwischen Anmischen und Versuchsbeginn.

Zellkulturtests stehen immer am Anfang einer biologischen Materialprüfung.

Aus der Vielzahl der von der Industrie entwickelten neuen zahnärztlichen Werkstoffe können damit unter Berücksichtigung der Empfindlichkeit verschiedener Testsysteme und unter Abwägung des therapeutischen Werts diejenigen ausgewählt werden, bei denen weitere, zeit- und kostenaufwendige und mit ethischen Problemen belastete Prüfungen im Anwendungstest und später im klinischen Versuch am Patienten vertretbar und auch sinnvoll erscheinen.

Zellkultur-Tests werden niemals Tierversuche und die klinische Erprobung am Patienten vollständig ersetzen können. Es besteht jedoch die Hoffnung, daß in Zukunft, wenn wir noch mehr über Zellkultur-Systeme wissen, durch einen vermehrten Einsatz solcher Verfahren die Zahl der Experimente am Tier und am Menschen zumindest reduziert werden kann.

Zusammenfassung

Obwohl bis heute keine verbindlichen Spezifikationen zur Bestimmung der Gewebeverträglichkeit zahnärztlicher Materialien bestehen, erscheint uns eine solche Prüfung dringend erforderlich. Klinische Tests sind als letzte Stufe einer Materialprüfung sehr wertvoll, als alleinige Methode zur Bestimmung der Gewebeverträglichkeit reichen sie nicht aus. Anwendungstests an hochentwickelten Versuchstieren bieten bessere experimentelle Möglichkeiten. Aus ökonomischen und tierschützenden Überlegungen muß jedoch eine gewisse Vorauswahl getroffen werden. Zellkulturen, sind, wie eigene Untersuchungen gezeigt haben, durchaus in der Lage, eine erste Information über die Giftigkeit eines Materials zu liefern.

Unter Abwägung des therapeutischen Werts kann dann entschieden werden, ob die Entwicklung dieses neuen Materials weiter verfolgt werden soll. □